



Bel BioLab

Протокол постановки реакции ПЦР с 2-кратной смесью реагентов 2X Fast Probe qPCR Mastermix с детекцией результатов в режиме реального времени:

1. Разморозьте все растворы при +4°C. Аккуратно перемешайте, не вортируйте. Центрифугируйте все растворы 1-5 сек.
2. Приготовьте общую реакционную смесь, добавляя все компоненты, кроме ДНК. Руководствуйтесь данными таблицы 2 для смеси объемом 25 мкл. При смешивании реагентов для X проб делайте смесь для X+1 пробы.

Таблица 1. Состав реакционной смеси для постановки ПЦР-РВ

Компонент	Кол-во
2X Fast Probe qPCR Mastermix	12,5 мкл
Прямой праймер	0,3 мкМ*
Обратный праймер	0,3 мкМ*
Зонд	0.2 мкМ
ДНК	Определяется пользователем
Вода	до 25 мкл

* В большинстве случаев концентрация праймеров 0,3 мкМ является оптимальной. При необходимости можно оптимизировать концентрацию олигонуклеотидов в диапазоне от 0,05 до 0.9 мкМ.

3. Смешайте все компоненты и распределите необходимое количество по пробиркам.
4. Добавьте ДНК в пробирки.
5. Аккуратно перемешайте смесь. Избегайте образования пузырьков. Отцентрифугируйте в течение 5-10 сек.
6. Введите программу в амплификатор.

Условия амплификации:

Мы рекомендуем использовать протокол с двумя циклами. Данный протокол подходит для олигонуклеотидов, имеющих Tm не менее 60°C.

Таблица 2. Температурный профиль ПЦР-РВ

Шаг	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95	2 мин	1
Денатурация	95	5 сек	45 циклов
Отжиг/элонгация	60	15 сек*	

* Считывание данных должно быть установлено в конце данного цикла.

Время в данном цикле может быть увеличено до 30 сек и подбирается эмпирически.

Проведите анализ результатов согласно рекомендациям фирмы производителя прибора.